

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

07.06.2004

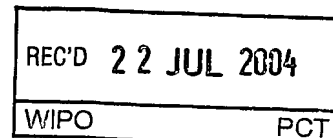
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 6月 6日

出願番号
Application Number: 特願2003-161887
[ST. 10/C]: [JP2003-161887]

出願人
Applicant(s): 旭メディカル株式会社

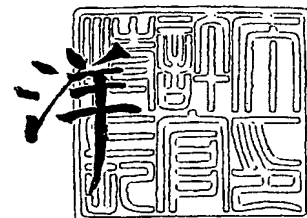


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 7月 8日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願

【整理番号】 A31382A

【提出日】 平成15年 6月 6日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

 【住所又は居所】 大分県大分市大字里 2 1 1 1 番地 2 旭メディカル株式
 会社内

 【氏名】 岩元 潮

【発明者】

 【住所又は居所】 大分県大分市大字里 2 1 1 1 番地 2 旭メディカル株式
 会社内

 【氏名】 徳島 恭雄

【発明者】

 【住所又は居所】 大分県大分市大字里 2 1 1 1 番地 2 旭メディカル株式
 会社内

 【氏名】 北口 暢哉

【特許出願人】

 【識別番号】 000116806

 【氏名又は名称】 旭メディカル株式会社

【代理人】

 【識別番号】 110000109

 【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス

 【代表者】 今村 正純

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 170347

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 創傷治癒促進材

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 少なくとも白血球および／または血小板が表面に存在するシート状多孔質材料から成り、該シート状多孔質材料の厚さが 0. 0 1 mm から 3 mm であることを特徴とする創傷治癒促進材。

【請求項 2】 シート状多孔質材料が、平均繊維直径 0. 3 μ m 以上 5 0. 0 μ m 未満、嵩密度 0. 0 5 から 0. 5 g / c m³ の不織布である、請求項 1 記載の創傷治癒促進材。

【請求項 3】 シート状多孔質材料が、平均孔径 1. 0 μ m 以上 4 0 μ m 未満のスポンジ状構造体である、請求項 1 記載の創傷治癒促進材。

【請求項 4】 白血球および血小板が創傷をもつ患者の自己由来である、請求項から 3 の何れかに記載の創傷治癒促進材。

【請求項 5】 白血球および血小板が末梢血、骨髓液または臍帯血由来である、請求項 1 から 4 の何れかに記載の創傷治癒促進材。

【請求項 6】 さらに線維芽細胞がシート状多孔質材料の表面に存在する、請求項 1 から 5 の何れかに記載の創傷治癒促進材。

【請求項 7】 線維芽細胞が皮膚由来である、請求項 6 記載の創傷治癒促進材。

【請求項 8】 線維芽細胞が創傷をもつ患者の自己由来である、請求項 6 または 7 記載の創傷治癒促進材。

【請求項 9】 さらにフィブリンがシート状多孔質材料の表面に存在する、請求項 1 から 8 の何れかに記載の創傷治癒促進材。

【請求項 1 0】 フィブリンが創傷をもつ患者の自己由来である、請求項 9 記載の創傷治癒促進材。

【請求項 1 1】 少なくとも白血球および／または血小板を厚さ 0. 0 1 m m から 3 m m のシート状多孔質材料に含ませる工程を含む、少なくとも白血球および／または血小板が表面に存在するシート状多孔質材料から成る創傷治癒促進材の調製方法。

【請求項 1 2】 シート状多孔質材料に線維芽細胞を播種する工程をさらに含む、請求項 1 1 記載の創傷治癒促進材の調製方法。

【請求項 1 3】 シート状多孔質材料にフィブリンを含ませる工程をさらに含む、請求項 1 1 または 1 2 記載の創傷治癒促進材の調製方法。

【請求項 1 4】 さらに創傷治癒促進材を培養する工程を含む、請求項 1 1 から 1 3 の何れかに記載の創傷治癒促進材の調製方法。

【請求項 1 5】 請求項 1 から 1 0 の何れかに記載の創傷治癒促進材を調製するための創傷治癒促進材調製装置であって、細胞浮遊液を注入及び排出するための入口と出口とを有し、開放可能な液密容器の中に、上記入口と出口の間に位置するように厚さ 0. 0 1 mm から 3 mm であるシート状多孔質材料が配置されている、創傷治癒促進材調製装置。

【請求項 1 6】 シート状多孔質材料を反物状に巻いてなる、請求項 1 5 記載の創傷治癒促進材調製装置。

【請求項 1 7】 容器が可撓性材料からなる、請求項 1 5 または 1 6 記載の創傷治癒促進材調製装置。

【請求項 1 8】 滅菌袋に包装され、滅菌されてなる、請求項 1 5 から 1 7 の何れかに記載の創傷治癒促進材調製装置。

【請求項 1 9】 液密容器が、細胞浮遊液を注入及び排出するための入口と出口が外部に連通した状態で滅菌袋に包装され、なおかつ装置全体がさらに滅菌袋に包装された状態で滅菌されてなる、請求項 1 5 から 1 8 の何れかに記載の創傷治癒促進材調製装置。

【請求項 2 0】 請求項 1 から 1 0 の何れかに記載の創傷治癒促進材を創傷部に貼り付けることを特徴とする、創傷部位の再生を促進する方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、創傷治癒を促進するための創傷治癒促進材、その調製方法、調製装置、及びそれを用いた創傷部位の再生促進方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

近年創傷の治癒に関するメカニズムが次第に明らかになってきている。白血球、血小板といった血液中の細胞が産生するさまざまな成長因子が組織の再生に重要な働きをする。例えば、血小板由来の成長因子のひとつとして発見されたPDGF(血小板由来成長因子、platelet-derived growth factor)は間葉系由来細胞の増殖促進因子として働き、また単球、好中球の強力な走化性作用因子である。

【0003】

Pierce GFらのグループは、ウサギの耳に軟骨まで達する傷をつくり、PDGF-BBを投与したところPDGF-BBを投与しない傷よりも速やかに損傷の修復が行われることを示している(非特許文献1)。PDGFはその名前が示すとおり血小板に大量に含まれるが、それ以外にマクロファージや血管内皮細胞、平滑筋細胞などの細胞でも産生されている。

【0004】

PDGF-BBの他にもTGF- β (形質転換性成長因子、transforming growth factor)、FGF(線維芽細胞成長因子、fibroblast growth factor)、VEGF(血管内皮増殖因子、vascular endothelial growth factor)などの成長因子が創傷の治療に有効であることが示され、臨床応用されるようになってきている。

【0005】

また最近の研究では、ヒト末梢血中の単核球細胞をin vitroで培養することにより、単球/マクロファージの細胞表面マーカーであるCD14を発現する細胞分画が血管前駆細胞のVEGF、HGF(肝細胞成長因子; hepatocyte growth factor)、G-CSF(granulocyte colony stimulating factor)を産生する(非特許文献2)という報告もされており、新たに血管新生への効果からも白血球の創傷治癒効果が期待されている。

【0006】

成長因子を投与する方法としては、全身に投与するよりも局所的かつ持続投与するのが望ましい。全身投与では、投与量が多すぎる場合には例えばVEGFでは低血圧、FGF-2では腎毒性の危険性が示唆されている。しかし、局所投与では局所での成長因子の濃度を保持するのが困難である。また、創傷治癒における細胞同

士の情報のやりとりは上に挙げたような多種の因子の作用する複雑な系であるから、単独の成長因子投与よりも多種の成長因子の投与がさらに有効であると考えられる。局所投与を実現する別法としては遺伝子治療が考えられるが、遺伝子治療は現在まだ安全性が十分に確立されていない。

【0007】

創傷治癒促進の目的で幾つかの技術が開発されている。その一つは、遠心分離により成長因子を産生する血小板を血液から濃縮し、これにフィブリノーゲンとトロンビンを加えて血小板糊を調製し、創傷部位に塗布する方法である。この方法では調製に時間と手間がかかり、また、糊の機械的強度が低いという問題があった（非特許文献3）。

【0008】

また、細胞を含むゲルの機械的強度を強くするために、高分子材料成型物からなる骨格の内部に線維芽細胞等の細胞を含むゲルを形成させた医用材料が提案されている（特許文献1）。この特許文献1には、白血球、血小板等をこのゲルの中に含むことが提案されておらず、人工皮膚の開示はあるが、創傷治癒促進の効果は期待できない。またゲル中の細胞は、ゲル内に固定されているため細胞が何らかの因子を産生したとしても、その因子が創傷部位に到達するのに時間を要する。

【0009】

特許文献2には移植片を基体（substrate）表面に付着させる為のキットが提案されているが、移植片の成長を促す為に血小板を更に付着させることが記載されている。しかしながら特許文献2は主に骨の移植片に関する発明であり、創傷の治癒促進、すなわち生体側創傷部位の細胞の成長を促進することを目的としたものではない。また、白血球を移植片に付着させることに関する記載も一切無い。

上述のとおり、創傷治癒に効果のある自己の血液細胞を短時間で効率よく濃縮し、創傷治癒の促進材として活用できる手法が望まれていた。

【0010】

【非特許文献1】

J. Cell Biochem. 1991 45: 319-326

【非特許文献 2】

Circulation. 2003 107: 1164-1169

【非特許文献 3】

Int. J. Artif. Organs. 2002 25(4):334-8

【特許文献 1】

特開 2001-204807 号公報

【特許文献 2】

米国特許第 6049026 号明細書

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は上記した従来技術の問題点を解消することを解決すべき課題とする。即ち、本発明は、創傷治癒に効果のある細胞を短時間で効率よく濃縮し、創傷治癒の促進材として活用するための手段を提供することを解決すべき課題とした。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、厚さ 0.01 mm から 3 mm のシート状多孔質材料の表面に白血球および／または血小板を存在させたものを創傷治癒促進材として使用することによって、線維芽細胞の増殖率を向上できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0013】

即ち、本発明によれば、少なくとも白血球および／または血小板が表面に存在するシート状多孔質材料から成り、該シート状多孔質材料の厚さが 0.01 mm から 3 mm であることを特徴とする創傷治癒促進材が提供される。

好ましくは、シート状多孔質材料は、平均繊維直径 0.3 μ m 以上 50.0 μ m 未満、嵩密度 0.05 から 0.5 g/cm³ の不織布である。

好ましくは、シート状多孔質材料は、平均孔径 1.0 μ m 以上 40 μ m 未満のスポンジ状構造体である。

【0014】

好ましくは、白血球および血小板は創傷をもつ患者の自己由来である。

好ましくは、白血球および血小板は末梢血、骨髓液または臍帯血由来である。

【0 0 1 5】

好ましくは、さらに線維芽細胞がシート状多孔質材料の表面に存在する。

好ましくは、線維芽細胞は皮膚由来である。

好ましくは、線維芽細胞は創傷をもつ患者の自己由来である。

好ましくは、さらにフィブリンがシート状多孔質材料の表面に存在する。

好ましくは、フィブリンは創傷をもつ患者の自己由来である。

【0 0 1 6】

本発明の別の側面によれば、少なくとも白血球および／または血小板を厚さ 0 . 0 1 mm から 3 mm のシート状多孔質材料に含ませる工程を含む、少なくとも白血球および／または血小板が表面に存在するシート状多孔質材料から成る創傷治癒促進材の調製方法が提供される。

本発明の調製方法は好ましくは、シート状多孔質材料に線維芽細胞を播種する工程をさらに含む。

本発明の調製方法は好ましくは、シート状多孔質材料にフィブリンを含ませる工程をさらに含む。

本発明の調製方法は好ましくは、さらに創傷治癒促進材を培養する工程を含む。

【0 0 1 7】

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の創傷治癒促進材を調製するための創傷治癒促進材調製装置であって、細胞浮遊液を注入及び排出するための入口と出口とを有し、開放可能な液密容器の中に、上記入口と出口の間に位置するように厚さ 0 . 0 1 mm から 3 mm であるシート状多孔質材料が配置されている、創傷治癒促進材調製装置が提供される。

【0 0 1 8】

好ましくは、シート状多孔質材料は反物状に巻かれている。

好ましくは、容器は可撓性材料からなる。

好ましくは、滅菌袋に包装され、滅菌されてなる装置が提供される。

好ましくは、液密容器は、細胞浮遊液を注入及び排出するための入口と出口が外部に連通した状態で滅菌袋に包装され、なおかつ装置全体がさらに滅菌袋に包装された状態で滅菌されている。

【0019】

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の創傷治癒促進材を創傷部に貼り付けることを特徴とする、創傷部位の再生を促進する方法が提供される。

【0020】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本発明で用いるシート状多孔質材料は、0.01mmから3mmの厚さを有する多孔質材料である。シート状多孔質材料はフィルター層としての機能、即ち、血液等の体液より特定の血球を捕捉しうるフィルター層としての機能を有することが好ましい。さらに好ましくは、シート状多孔質材料は、本発明において捕捉対象となる白血球および／または血小板を選択的に捕捉しうるフィルター層材料で構成されている。

【0021】

シート状多孔質材料の形態としては、不織布、織布、スポンジ状構造体、粒子をシート状の袋に詰めたものなどが例示できる。この中でも、捕捉対象物として白血球や血小板を意図する場合には、除去効率という観点から、不織布やスポンジ状構造体がより好ましい。

【0022】

本明細書で言う不織布とは、一層以上の繊維の塊を製編織しないで布状構造としたものを言う。繊維の素材としては、合成繊維、天然繊維、無機繊維等が用いられる。中でも合成繊維、例えばポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレート、ナイロン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリアクリロニトリル等の繊維が好ましく用いられる。

【0023】

本発明で用いるシート状多孔質材料の厚みは、創傷治癒効果を高めるために0.01mmから3.0mmであり、好ましくは0.05mmから2.5mm、よ

り好ましくは0.1mmから2.0mmである。シート状多孔質材料の厚みが3.0mmより大きくなると、創傷部位への固定が困難になるとともに、白血球や血小板からの成長因子が創傷部位に届きにくくなってしまう。また、シート状多孔質材料の厚みが0.01mmより小さいと機械的強度が弱くなってしまう。細胞から産生される成長因子はその細胞自らに作用（自己分泌、autocrine）し、さらに強く作用する場合と、周辺の細胞から産生され拡散した成長因子が作用（傍分泌、paracrine）しあうことにより、細胞間で効果が増強される場合がある。従って、成長因子をより効果的に機能させるためには細胞同士の距離がなるべく近いことが望ましいため、フィルター層の厚みは上記の範囲内であることが望ましい。また、シート状多孔質材料は一枚で上記の厚みを持つものを使用してもよいし、厚みの小さいものを二枚以上重ねて使用することもできる。

【0024】

シート状多孔質材料が不織布である場合の繊維の平均直径は、好ましくは0.3 μ m以上50.0 μ m未満であり、より好ましくは0.5 μ m以上40.0 μ m以下であり、さらに好ましくは0.7 μ m以上35.0 μ m以下であり、さらに好ましくは1.0 μ m以上20.0 μ m以下であり、特に好ましくは1.0 μ m以上9.0 μ m以下である。平均直径が0.3 μ mより小さくなると血液細胞浮遊液や血液を不織布に流すときに流動性が悪くなって装置内の圧力損失が高くなる。また、平均直径が50.0 μ mより大きいと白血球および／または血小板の捕捉率が悪くなってしまう。また、白血球および／または血小板の捕捉率が悪くなると、結果としてシート状多孔質材料内に捕捉された細胞間の距離が大きくなってしまうため、前述のとおり産生された成長因子がより効果的に機能するためにも繊維の平均直径は上記の範囲が好ましい。

【0025】

本発明で用いる不織布を構成する繊維の平均直径は、例えば不織布を構成している繊維の走査型電子顕微鏡写真を撮り、無作為に選択した100本以上の繊維の直径を測定し、それらを数平均する方法で求められる。

【0026】

本発明で用いる不織布の嵩密度は、好ましくは0.05g/cm³から0.5

g/cm^3 、更に好ましくは $0.07 \text{ g}/\text{cm}^3$ から $0.4 \text{ g}/\text{cm}^3$ 、より好ましくは $0.1 \text{ g}/\text{cm}^3$ から $0.3 \text{ g}/\text{cm}^3$ が良い。嵩密度が $0.5 \text{ g}/\text{cm}^3$ より大きくなると細胞浮遊液や血液を不織布に流すときに流動性が悪くなって圧力損失が高くなる。また、嵩密度が $0.05 \text{ g}/\text{cm}^3$ より小さいと細胞捕捉率が悪くなってしまふとともに、前述のとおり捕捉された細胞間の距離が大きくなってしまふため、前述のとおり産生された成長因子がより効果的に機能するためにも繊維の嵩密度は上記の範囲が好ましい。

【0027】

また本発明でいうスポンジ状構造体とは、連続開放気孔を有する三次元網目状連続組織を有する構造体をいう。スポンジ状構造体の材質は特に限定されず、セルロースやその誘導体などの天然高分子、あるいはポリオレフィン、ポリアミド、ポリイミド、ポリウレタン、ポリエステル、ポリサルホン、ポリアクリロニトリル、ポリエーテルサルホン、ポリ(メタ)アクリレート、ブタジエン・アクリロニトリル共重合体、エチレン・ビニルアルコール共重合体、ポリビニルアセタールもしくはそれらの混合物などの高分子材料を例示できる。

【0028】

スポンジ状構造体の平均孔径は好ましくは $1.0 \mu\text{m}$ 以上 $40 \mu\text{m}$ 以下であり、より好ましくは $2.0 \mu\text{m}$ 以上 $35 \mu\text{m}$ 以下であり、さらに好ましくは $3.0 \mu\text{m}$ 以上 $30 \mu\text{m}$ 以下である。平均直径が $1.0 \mu\text{m}$ より小さくなると細胞浮遊液や血液をスポンジ状構造体に流すときに血液の流動性が悪くなり、装置内の圧力損失が高くなる。また、平均直径が $40 \mu\text{m}$ より大きいと白血球捕捉率が悪くなってしまふ。また、スポンジ状構造体の平均孔径が大きくなると、結果としてフィルター層内に捕捉された細胞間の距離が大きくなってしまふため、前述のとおり産生された成長因子がより効果的に機能するためにもスポンジ状構造体の平均孔径は上記の範囲が好ましい。

【0029】

本発明に言うスポンジ状構造体の平均孔径とは、水銀圧入法で測定して得られた値である。水銀圧入法(例えば島津製作所、ポアサイザ 9320)による測定により、縦軸に細孔の容量の微分値をとり、横軸に孔径をとってグラフを描き、

そのピークに当たる点（最頻値）を平均孔径とする。なお、水銀圧入法による測定値としては1～2650 p s i a の圧力範囲で測定した値を用いる。

【0030】

さらに、シート状多孔質材料の表面には、捕捉対象物質のみを選択的に吸着捕捉できるようにするために高分子をコーティングまたはグラフト処理などを行うこともできる。例えば、白血球は吸着しやすいが血小板は吸着し難いポリマーをコーティングまたは固定化したシート状多孔質材料と、血小板を吸着しやすいシート状多孔質材料とにこの順で血液や細胞浮遊液を処理することにより、血小板をより選択的に接着したシート状多孔質材料を調製することもできる。また、血球もしくは血漿タンパク質などの特定成分をより選択的に吸着しうるリガンドをコーティングまたは固定化してもよい。

【0031】

シート状多孔質材料には、生分解性である素材を用いることもできる。生体吸収性の素材としては、例えばポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸とグリコール酸の共重合体、ポリリンゴ酸、ポリ-ε-カプロラクトンなどのポリエステル或いはセルロース、ポリアルギン酸などの多糖類等を挙げることができる。これらの素材を用いることで、より生体適合性の高い創傷治癒促進材とすることができる。

【0032】

本発明の創傷治癒促進材を調製するための細胞浮遊液は、少なくとも白血球および／または血小板を含む浮遊液であり、末梢血、骨髓、臍帯血そのままであってもよいし、予め特定の細胞分画を除去した細胞浮遊液であってもよい。さらに、細胞浮遊液に含まれる細胞は創傷を持つ患者自身の細胞であることが好ましい。

【0033】

本発明の創傷治癒促進材には線維芽細胞を組み込むことができる。線維芽細胞は血液細胞浮遊液とは別に、シート状多孔質材料と接触させることで組み込むこともできるが、予め血液細胞を含む細胞浮遊液に混合させてから、シート状多孔質材料と接触させてもよい。また、線維芽細胞のみをさらに別の材料（フィルタ

一層)に付着させた後、血液細胞を付着させたシート状多孔質材料と組み合わせることもできる。線維芽細胞はとくに創傷部位に含まれるものと同じ線維芽細胞を組み込むことが好ましく、これにより創傷部位の治癒を促進できる。

【0034】

本発明の創傷治癒促進材は、その調製過程で培養することもできる。培養液は特に限定されず、通常細胞培養で用いられるものであればよい。さらに血液細胞を活性化する因子を加えて培養することもできる。例えば、トロンビン等の血小板活性化剤を入れてから培養することで局所的な成長因子の濃度を高めることができる。

【0035】

本発明の創傷治癒促進材には、さらにフィブリンを含んでいてもよい。フィブリンを調製するためのフィブリノーゲン溶液としては特に特定されないが、製剤として市販されているものを使用することができる。また血液細胞浮遊液として血液を用いた際にシート状多孔質材料からドレインとして回収される液を遠心し、これを濃縮して用いることもできる。また、線維芽細胞を含む場合には、細胞は予めフィブリンに包埋する形態でもよいし、フィブリンに後から細胞のみを播種してもよい。フィブリンを含むことで、創傷部位への創傷治癒促進材の固定化が容易となるうえに、フィブリンゲル内に含まれる他の成長因子によりさらに創傷の治癒促進効果を上げることができる。

【0036】

本発明はさらに、本発明の創傷治癒促進材を調製するための装置であって、細胞浮遊液を注入及び排出するための入口と出口とを有し、開放可能な液密容器の中に、上記入口と出口の間に位置するように厚さ0.01mmから3mmであるシート状多孔質材料が配置されている創傷治癒促進材調製装置にも関する。

【0037】

本発明の装置に使用される容器の形状は特に限定されず、シート状多孔質材料を収納しやすく、液密になっており、細胞浮遊液がシート状多孔質材料を流れやすい形状であればよい。シート状の多孔質材料をそのまま收容するのであれば平板型、反物状にして收容するのであれば円筒型が収納しやすい。さらに、平板型

容器に可撓性材料を使用し、平板型容器全体を反物状に巻くことによりコンパクトな状態とすることもできる。

【0038】

容器は多孔質材料を取出すために開放可能な状態となることが必要である。このために容器本体がネジ式、パッキング式、すり合わせ式になっていることなどが好ましい。または、開放可能な手段がなくても容器の全体もしくは一部が外側から容易に破壊可能な材料や構造からなっているもよい。

【0039】

本発明の創傷治癒促進材調製装置には、また、細胞浮遊液を無菌的に流すために容器入口側に採血バッグと接続するためのスパイク針付きのチューブを接続することもできる。単にチューブだけを取り付けておき、無菌接続器で接続してもよい。また、ドレイン液を用いて血漿又は血清を調製することを容易にするために容器の出口側に遠心用のバッグを接続することもできる。

【0040】

本発明の創傷治癒促進材調製装置を滅菌袋に包装する場合、シート状多孔性材料を収容する容器を滅菌袋に包装し、さらに装置全体を別の滅菌袋で包装してもよい。こうすることにより、細胞浮遊液を流した後に多孔質材料を実際に創傷部位に貼り付けるまでの間容器および多孔質材料を無菌的に保持可能となり、取扱い性が著しく向上する。

以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【0041】

【実施例】

実施例1：創傷治癒促進材の調製

血液細胞を表面に付着させたシート状多孔質材料を以下の方法で調製した。

健康人のボランティアより、抗凝固剤としてCPD (citrate-phosphate-dextrose) を用いて末梢血を採取した (血液: CPD = 400 : 56)。ポリエチレンテレフタレート製の不織布 (旭化成株式会社、平均繊維径 $2.6\mu\text{m}$ 、厚み 0.38mm 、嵩密度 0.27g/cm^3) を 25mm 径に打ちぬき、これを2枚重ねてカラム (アドバンテッ

ク社、型番PP-25) にて保持し、カラムに末梢血 5 ml を流した。

血液を流した後に連続して、カラムにリン酸緩衝液 10 ml を流して洗浄し、血液細胞を表面に付着させたシート状多孔質材料から成る創傷治癒促進材を得た。

【0042】

上記操作を別々に 2 回施行したが、処理に要する時間はいずれも 10 分以内であった。

処理前後の血液中に含まれる白血球、血小板数を血球計算盤により測定した。不織布フィルター層による白血球および血小板の捕捉率は以下の表 1 の通りであった。

【0043】

【表 1】

表 1

	白血球捕捉率	血小板捕捉率
1 回目	74.5%	83.3%
2 回目	68.6%	67.4%

【0044】

試験例：線維芽細胞の増殖率の測定

実施例 1 にて調製した血液細胞を表面に付着した不織布創傷治癒促進材と、線維芽細胞とを共培養して、線維芽細胞の増殖率を検討した。

培養容器としては、3 μ m のポアサイズの膜で隔てられたインサートを有するマルチプルウェル培養用プレート（コーニング社、トランスウェル 3452）を用いた。

インサートの膜で隔てられた上側に実施例 1 にて血液処理を行った不織布（即ち、血液細胞を表面に付着した本発明の創傷治癒促進材）2 枚を入れ、下側にヒト胎児肺由来の正常二倍体線維芽細胞株（HEL, human embryonic lung fibroblast）を播種した。細胞の播種密度は、各 1×10^5 個/ウェルとした。

【0045】

Basal Medium Eagle (Sigma社、B1522)にメーカー指定の通り、ピルビン酸ナトリウム (ICN社) を 1 mM、100倍濃縮非必須アミノ酸 (ICN社、Cat.#1681049) を 100倍希釈となるように、そしてグルタミンを 2 mMとなるように添加した。これにさらに、最終濃度が 10%となるように牛胎児血清 (FCS、StemCell Technologies社) と、抗生物質としてペニシリン及びストレプトマイシンを添加して、培養液を作製した。培養液の容量は 4 ml / ウエルとした。

また、コントロールとしては、血液で処理していない不織布とHELとの共培養を行った。

上記の培養物を、5% CO₂、37℃のインキュベーターで4日間培養後、線維芽細胞の数を測定した。結果を表2に示す。線維芽細胞の回収には0.25% Trypsin/EDTA液 (ギブコ社) を用いた。

【0046】

【表2】

表2

	血液を流した不織布	不織布のみ
細胞数	5.00x10 ⁵ 個/ウエル	2.02x10 ⁵ 個/ウエル

【0047】

表2に示す通り、実施例1で作製した血液処理を行った不織布から成る本発明の創傷治癒促進材を用いて培養することにより、血液処理を行わない不織布を用いた場合と比較して、線維芽細胞の増殖能が高くなることが実証された。

【0048】

【発明の効果】

本発明によれば、簡便な操作で短時間のうちに血液細胞を濃縮した創傷治癒促進材を調製できる。本発明の創傷治癒促進材は細胞の増殖を促進する効果を有することから、本発明の創傷治癒促進材を用いることによって創傷の治癒を促進することができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 創傷治癒に効果のある細胞を短時間で効率よく濃縮し、創傷治癒の促進材として活用するための手段を提供すること。

【解決手段】 少なくとも白血球および／または血小板が表面に存在するシート状多孔質材料から成り、該シート状多孔質材料の厚さが0.01mmから3mmであることを特徴とする創傷治癒促進材。

【選択図】 なし

特願 2003-161887

出願人履歴情報

識別番号

[000116806]

1. 変更年月日
[変更理由]

住 所
氏 名

1998年 6月11日

住所変更

東京都千代田区神田美土代町9番地1

旭メディカル株式会社